慢性炎症と骨代謝

—— アジュバント関節炎ラット尿中のピリジニウム——

クロスリンク含量に及ぼすメトトレキサートの影響 ——

瀬川美秀・小俣武志・続池直樹・糸数義彦・
吉田研次・岡 秀樹・松田和夫*

The effect of methotrexate on the urinary pyridinium crosslink level in adjuvant-induced arthritis in rats

The effect of methotrexate on bone metabolism was investigated in adjuvant arthritis in rats (AA rats). Methotrexate was orally administered to rats for 28 days from the next day after adjuvant inoculation. Twenty four-hour urine samples were obtained before sacrifice, pyridinoline (PY) and deoxypyridinoline (DPY), and creatinine concentrations in urine were measured by HPLC and the alkaline picronate method, respectively. Urinary PY and DPY in AA rats were increased 3.8 and 2.7 times that of age-matched controls, respectively. Doses of 0.05, 0.1 and 0.2 mg/kg caused a dose-dependent inhibition of the inflammatory parameters (fibrinogen, A/G) and the excretion of urinary PY and DPY in AA rats. Indomethacin (1 mg/kg, p. o.) had a significant inhibitory effect on both inflammatory parameters and urinary PY, but not on DPY. Moreover, the fourth lumbar of vertebra was used for determination of morphological changes. The trabecular number in the vertebra in the AA rats significantly decreased in comparison with that of age-matched normal. Methotrexate (0.05, 0.1 and 0.2 mg/kg) dose-dependently and completely inhibited severe changes observed in the vertebra of AA rats, while indomethacin only partly inhibited these changes. The present study indicates that MTX can prevent bone destruction in AA rats and measurement of urinary DPY is a useful marker for examination the effect of drugs on bone destruction.

Rec. 4/7/1995, Acc. 4/18/1995, pp 329~335

*Yoshihide Segawa・Takeshi Omata・Naoki Tsuzuike・
Yoshihiko Itokazu・Kenji Yoshida・Hideki Oka・Kazuo Matsuda**
key words : bone destruction, urinary pyridinium crosslinks,

adjuvant arthritis rat, methotrexate

慢性関節リウマチ(RA)患者では、炎症による関節軟骨および骨の破壊や周辺組織の細胞外マトリックス代謝異常が認められており、尿中に代謝性骨疾患における骨吸収の特異的マーカーであるピリジニウムクロスリンクの増加が報告¹⁾され

るとともに、これら診断の有用性が近年注目されてきている。なかでも、デオキシピリジノリン(DPY)は骨に特異的に存在し骨の分解を知る一つの指標となることが種々報告²⁾されており、筆者らも、RAの病態に類似点が知られているアジュバント関節炎ラット(AA)モデルで、炎症の進展に伴い経日的にDPY量が尿中に増加すること³⁾、また、AAラットにおけるDPY量の増加は、二次炎症がはじまる発症10日目より徐々に増加し、骨吸収の亢進がうかがえるが、腰椎骨量の増加抑制はすでにAA発症早期から認められるこ

* Department of Pharmacology, Central Research Laboratories, Zeria Pharmaceutical Company Co., Ltd. ゼリア新薬工業(株)中央研究所薬理第二研究部
Offprint requests to : Yoshihide Segawa, Department of Pharmacology, Central Research Laboratories, Zeria Pharmaceutical Company Co., Ltd. 2512-1 Oshikiri, Khonan-machi, Ohsato-gun, Saitama 360-01, Japan

などを示した⁴⁾。

一方、メトトレキセート(MTX)は免疫抑制剤でRAにおいてその有用性⁵⁾がすでに認められているが、臨床では、骨破壊を抑制するという報告⁶⁾と、しないという報告⁷⁾があり、一定の見解が得られていない。また、最近ではMTXが正常ラットの骨形成を抑制するという報告⁸⁾もあり、MTXの骨代謝に及ぼす影響は複雑である。そこで、今回筆者らは、慢性炎症時におけるMTXの骨代謝に及ぼす影響を明らかにする目的で、MTX投与後AAラットの尿中ピリジニウム-クロスリンクを指標に検討し、若干の知見を得たので報告する。

材料と方法

(1) 実験動物

SD系SPF雄性ラット5週齢を日本チャールスリバー(株)より購入し、室温 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 10\%$ の飼育環境下で1週間以上飼育したのち、実験に供した。また、飼育には、1.2%カルシウム、1.0%リン、および80IU/100gビタミンD₃を含む飼料(オリエンタル酵母工業(株))を用い、水道水は自由摂取させた。

(2) アジュバント関節炎ラットの発症

Pearsonら⁹⁾の方法に準じ、*Mycobacterium butyricum* (M. B, Difco社)を流動パラフィン(Merk社)に懸濁し、0.5mg M. B./ラットを右側足蹠部皮下に単回投与することにより発症させた(発症日を0日とした)。一方、別に溶媒のみを同部位に皮下投与した対照群を設けた。

投与足および非投与足の足容積は、plethysmometer(MK-550, 室町機械)で経日的(0, 4, 7, 10, 15, 21および27日目)に測定し、その値から各日における浮腫率を求め、 AUC_{0-27} (0日から27日までの曲線下面積)を算出した。また、同時に体重を測定し、0日と28日との体重差により増加量(g)を算出した。

(3) 群構成、使用薬物の調製および投与

群構成は、正常対照群、AA対照群およびMTX(Amethopterin, Sigma社)0.05, 0.1および0.2mg/kg/day投与群の3群のほか、比較対照薬としてindomethacin(IM, Sigma)1.0mg/kg/day

群の計6群を設け、それぞれ薬物は0.5% CMC-Na溶液に溶解もしくは懸濁して、1日1回28日間強制経口投与した。なお、AA対照群には0.5% CMC-Na溶液のみを投与した。また、実験は1群8匹のラットを用いた。

(4) 血清生化学的検査

投与最終日の翌日、麻酔下でラット腹部大動脈より採血し、一部は3.8%クエン酸ナトリウム溶液中(ベノJECT真空採血管, テルモ)に入れ、遠心分離後血漿を、また残りの血液はシリコンコートした真空採血管を用い血清をそれぞれ分離した。フィブリノーゲン(血漿)測定には、トロンビン凝固時間法(フィブリノーゲンBテストワコー, 和光純薬)を、また、A/G比(アルブミン/グロブリン, 血清)にはBCG-ビウレット法(A/G Bテストワコー, 和光純薬)をそれぞれ用いた。

(5) 脾臓重量

採血終了後脾臓を摘出し、天秤(Mettler AE-163)にて絶対重量を測定したのち、体重をもとに相対重量(g/100g体重)を算出した。

(6) 尿中ピリジノリン(PY), デオキシピリジノリン(DPY), およびクレアチニン(CRE)の定量

PY, DPYおよびCRE量の測定には、解剖日前日より解剖日までの24時間畜尿を用いた。

PYおよびDPY量の測定は、Black¹⁰⁾およびEyreら¹¹⁾の方法を参考に、尿500 μl を12N塩酸で加水分解(100 $^{\circ}\text{C}$, 16hr)したあと、CFIカラム(和光)を用いて吸着させ、ついで酢酸:n-ブタノール:水(1:4:7)で溶出し、乾固後1%へプタフルオロ酪酸に溶解させたものを測定用サンプルとしてHPLCで測定した。なお、カラムは、ODS-M-20(4.6mmID $\times$ 30mm, 和光)CAP-CELL PAKC₁₈ AG 120(4.6mmID $\times$ 250mm, 和光)を、検出機は、FB-S(日本分光)を用いた($\text{Ex}=296\text{nm}$, $\text{Em}=395\text{nm}$)。また、クレアチニンはアルカリピクリン酸法にて測定した。

(7) 病理組織学的検討

解剖日に採取した第4腰椎は、70%アルコールに固定し、非脱灰法によりMMA(methylmethacrylate)包埋後、V. Goldner染色を施し、顕微鏡

表 1 Paw swelling (AUC 0→27) and body weight gain of adjuvant arthritis rats treated methotrexate and indomethacin

Drug	Dose (mg/kg, p.o.)	AUC of paw swelling (from day 0 to 27)		Gain of body weight (g)
		Non-injected paw	Injected paw	
Normal				178.5± 9.03**
Control : AA		1134.6± 99.42	3212.4±191.28	50.3±11.78
Methotrexate	0.05	822.1±147.88 (28)	3134.9±281.57 (3)	84.3±10.94
	0.1	396.1±196.24** (65)	2246.8±290.28* (30)	131.6±13.79**
	0.2	204.0± 44.04** (82)	1160.4± 60.95** (64)	168.2± 9.75**
Indomethacin	1	397.3± 36.09** (65)	997.3± 82.14** (69)	109.6± 9.76**

Values are expressed as mean±SEM.

* or ** : P<0.05 or 0.01, Significance of differences between control and drug group (Dunnett).

AA : adjuvant arthritis. () : Inhibition % = (control-drug treatment)/control×100

図 1 The effects of methotrexate and indomethacin on spleen relative weight (a) and plasma fibrinogen level (b) in AA rats

Values are expressed as mean±SEM.

* or ** : P<0.05 or 0.01, Significance of differences between control and drug-treated group (Dunnett).

下一次海綿骨を中心に検討した。

(8) 統計処理

測定値は、mean±SE で示し、AA 対照群との有意差検定は、Dunnett 法による多重比較検定で行い、危険率 5 % 以下を有意差ありとした。

結 果

(1) ラットの足浮腫および体重

MTX および IM の AA ラットの足浮腫および

体重に対する影響を表 1 に示した。MTX 投与は、AA ラットで認められる *M. B.* 接種足および非接種足(発症 0 日から 27 日目までの足浮腫率を AUC で表示)をとともに用量依存的に有意に抑制し、その効果は、接種足よりも非接種足に強くみられた。また、比較薬である IM は接種足、非接種足ともに同程度の抑制効果を示し、さらに、その効果は MTX に比較して、非接種足では弱いものの接種足では同等であった。

一方、MTX 投与は AA でみられる体重のいちじるしい減少を用量依存的に、しかも 0.2 mg/kg では、完全に抑制した。これに対して、IM も体重減少の予防効果が認められるものの MTX にくらべて軽度であった。

(2) 脾臓重量およびフィブリノーゲン値

MTX および IM 投与後の脾臓重量およびフィブリノーゲン値に対する影響を図 1 に示した。MTX は、AA 発症により増加する脾臓相対重量を用量依存的に有意に抑制した。これに比し、IM には顕著な抑制効果はみられなかった。

一方、AA ラットの炎症進展により亢進するフィブリノーゲン値に対して、MTX は用量依存的かつ有意に、また IM は有意にそれぞれ抑制効果が認められた。

(3) 尿中ピリジニウム-クロスリンク含量

MTX および IM 投与後の尿中 PY および DPY 含量に対する影響を表 2 に示した。AA ラット発症 28 日目では、normal 群に比較して尿中 PY および DPY 含量の有意な増加が認められ

表 2 Urinary pyridium cross-link content for adjuvant arthritis rats treated methotrexate and indomethacin orally administered

Drug	Dose (mg/kg, p.o.)	Pyridinoline (μ mol/mol CRE)	Deoxypyridinoline (μ mol/mol CRE)	Ratio (PY/DPY)
Normal		42.6 $\pm$ 3.53**	29.2 $\pm$ 2.85**	1.5 $\pm$ 0.02
Control : AA		163.2 $\pm$ 27.70	79.6 $\pm$ 11.86	2.0 $\pm$ 0.09
Methotrexate	0.05	105.2 $\pm$ 25.29 (52)	56.6 $\pm$ 11.20 (46)	1.8 $\pm$ 0.08
	0.1	72.2 $\pm$ 23.26* (75)	43.0 $\pm$ 10.87* (73)	1.6 $\pm$ 0.13
	0.2	51.8 $\pm$ 2.58** (92)	37.8 $\pm$ 2.76* (83)	1.4 $\pm$ 0.06
Indomethacin	1	72.6 $\pm$ 4.56* (75)	52.4 $\pm$ 5.94 (54)	1.4 $\pm$ 0.11

Values are expressed as mean $\pm$ SEM.

* or ** : P<0.05 or 0.01, Significance of differences between control and drug group (Dunnett).

AA : adjuvant arthritis. () : Inhibition % = (control-drug treatment) / (control-normal) $\times$ 100

た。これら尿中両マーカー含量増加に対して、MTX は用量依存的かつ有意な抑制作用を示し、特に、IM で有意な抑制がみられなかった骨に特異的に存在する DPY の尿中排泄を、MTX 0.05 mg/kg 投与で 46%、0.1 mg/kg 投与で 73%、および 0.2 mg/kg 投与では 83%と、IM にくらべ強く抑制した。また、MTX では尿中 PY および DPY 含量ともに同程度の抑制効果がみられるものの、IM では DPY 含量に対する抑制作用は弱かった。

一方、AA ラットで上昇した尿中 PY/DPY 含量比は、MTX 0.2 mg/kg および IM 1.0 mg/kg 投与により、normal 値にまでの回復が認められた。

(4) 病理組織学的検査

Normal ラット、AA ラット(発症 28 日目)、MTX および IM 投与後の AA ラットにおける第 4 腰椎の海綿骨組織写真をそれぞれ図 2 に示した。normal ラットに比較して AA ラットでは、成長線下部の骨梁骨のいちじるしい断裂による数の減少ならびに連続性の低下が認められた(図 2 b)。これらの変化に対して MTX 投与は、用量依存的な予防効果がみられた(図 2 c, d, e)。

一方、IM 投与は AA ラットでみられた骨梁骨の連続性および数の減少を一部抑制はするものの、MTX 0.1 mg/kg 以上の用量に比較して顕著なものではなかった(図 2 f)。

考 察

コラーゲン線維網の構造体であるピリジニウム-クロスリンクには、PY および DPY の 2 因子が存在し、おもに軟骨、関節では PY が、また骨には DPY が比較的多量認められ、組織特異性、疾患特異性が高いといわれている^{12,13)}。さらに、RA 患者尿中では、PY および DPY の排泄量が臨床診断項目で従来より知られている C reactive protein(CRP), erythrocyte sedimentation rate (ESR)や骨密度(BMD, femoral neck)と相関することが報告^{1,14)}されており、ステロイド投与¹⁵⁾により排泄量が増加することも知られているが、RA 患者あるいは疾患動物モデルに MTX を投与し、尿中ピリジニウム-クロスリンク含量について調べた報告はない。

一方、MTX は、マクロファージの活性化抑制¹⁶⁾、IL-1¹⁷⁾およびコラゲナーゼ産生抑制¹⁸⁾、血管新生の抑制¹⁹⁾など RA に関与する各種因子を抑制し、RA 疾患を改善するものと考えられるが、MTX 投与における骨代謝、特に尿中ピリジニウム-クロスリンク含量に与える影響についての検討例はない。

本実験において MTX 投与は、AA ラットでみられる足浮腫および脾臓重量の増加、A/G 比の低下およびフィブリノーゲンの亢進のほか、尿中 PY および DPY の排泄量増加をそれぞれ用量依存的に有意に抑制した。なかでも MTX の DPY 含量に対する有意な抑制効果は IM 投与ではみられず、DPY が骨に特異的に存在していることな

図2 Histopathological findings of the fourth vertebral in AA rats
Normal rats(a), AA rats(b), methotrexate 0.05 mg/kg(c), 0.1 mg/kg(d), 0.2 mg/kg(e) and
indomethacin 1.0 mg/kg(f) treated rats, respectively. (V. Goldner stain, $\times 50$)

どを考えると、IM は AA ラットの様な疾患モデルの骨破壊を積極的に抑制しないことが推察される。また、IM のように AA ラットの炎症は強く抑制するものの、尿中 DPY の排泄抑制効果が弱いことは、AA ラットで起こる骨破壊の原因の多くにはプロスタグランジン類よりもサイトカインが関与していることを示唆しているのかもしれない。さらに、MTX の投与用量は、Jhonson¹⁶⁾ および Connolly²⁰⁾ らの報告に従い、上限を 0.2 mg/

kg とし連続経口投与したが、AA ラットでは白血球数の減少などの毒性所見は認められなかった。

筆者らはさらに、AA ラットを用い、発症に伴い経日的に尿中 DPY 含量が増加し、全身性骨破壊の亢進が炎症後期に認められること³⁾、また、この増加は AA ラット発症初期の骨形成の減少を伴い、おもに後期の骨吸収の亢進によること⁴⁾を組織形態計測でそれぞれ報告した。

この点からすると、今回認められた MTX の尿

中 DPY 排泄抑制が, AA ラットの初期における骨形成の抑制を改善した結果であるのか, 後期の骨吸収を抑制した結果であるのか興味深い, いずれにせよ MTX 投与により尿中 DPY 排泄の抑制がみられたことは, MTX に骨量減少を予防する作用があることを裏付けるものと考えられる. 事実, 筆者らは MTX 0.2 mg/kg 投与が AA ラットの腰椎でみられる骨量の減少⁴⁾をほぼ完全に抑制することを確認している(投稿準備中).

最近では, 正常ラットで MTX の骨形成抑制と骨吸収亢進が報告されている⁹⁾. しかし, AA ラットのような病態では, 炎症の発症時期, 進行度および程度などにより骨形成と骨吸収のバランスが微妙に変化し, 必ずしも MTX が正常ラットでみられたと同様な, 骨形成の減少を AA ラットに導くものではないと考える. また, Pozo²¹⁾らは AA ラットで免疫抑制薬 Cyclosporin A の骨量に及ぼす影響について検討し, Cyclosporin A は AA ラットで起こる骨量減少を抑制するばかりでなく, 骨量増加をも引き起こすことを報告している. したがって, 本実験で認められた MTX 投与によるピリジニウム-クロスリンクの抑制が, AA ラット初期に認められる骨量減少の抑制ばかりでなく, 骨量増加にもつながるかは大切な点であり, 現在組織形態計測を含め検討中である.

文 献

- Gough, A. K. S., Peel, N. F. A., Eastell, R., Holder, R. L., Lilley, J., Emery, P.: Excretion of pyridinium crosslinks correlates with disease activity and appendicular bone loss early rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 53: 14-17, 1994.
- Seibel, M. J., Duncan, A., Robins, S. P.: Urinary hydroxypyridinium crosslinks provide indices of cartilage and bone involvement in arthritic diseases. *J. Rheumatol.* 16: 964-970, 1989
- 瀬川美秀, 吉田研次, 続池直樹, 松田和夫: 慢性炎症と骨代謝—アジュバント関節炎ラット発症過程における尿中デオキシピリジノリン含量の変化. *炎症* 14: 337-339, 1994.
- Segawa, Y., Nakamura, T., Aota, K., Tanaka, Y., Yoshida, K., Tsuzuki, N., Matsuda, K.: Changes in urinary deoxypyridinoline level and vertebral bone mass in the development of adjuvant-induced arthritis in rats. *Bone* 17, in press, 1995.
- Schnabel, A., Gross, W. L.: Low-dose methotrexate in rheumatic diseases—efficacy, side effects, and risk factors for side effects. *Semi. Arth. Rheum.* 23 (5): 310-327, 1994.
- Reykdal, S., Steinsson, K., Sigurjonsson, K., Brekkan, A.: Methotrexate treatment of rheumatoid arthritis: Effects on radiological progression. *Scand. J. Rheum.* 18: 221-226, 1989.
- Sany, J., Kaliski, S., Couret, M., Cuchacovich, M., Daures, J.: Radiologic progression during intramuscular methotrexate treatment of rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 17: 1636-1641, 1990.
- May, K. P., West, S. G., Mcdermott, M. T., Huffer, W. E.: The effect of low-dose methotrexate on bone metabolism and histomorphometry in rats. *Arth. Rheum.* 37: 201-206, 1994.
- Pearson, C. M., Wood, F. D.: Factors which modify adjuvant-induced arthritis. *Arth. Rheum.* 5: 654-658, 1962.
- Black, D., Farquharson, C., Robins, S. P.: Excretion of pyridinium cross-links of collagen in ovariectomized rats as urinary markers for increased bone resorption. *Calcif. Tissue Int.* 44: 343-347, 1989.
- Eyre, D. R., Koob, T. J., Van Ness, K. P.: Quantitation of hydroxypyridinium crosslinks in collagen by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 137: 380-388, 1984.
- Fujimoto, D., Moriguchi, T., Ishida, T., Hayashi, H.: The structure of pyridinoline, a collagen cross-link. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84: 52-57, 1978.
- Robins, S. P.: Crosslinking of collagen. Isolation, structural characterization and glycosylation of pyridinoline. *Biochem. J.* 215: 167-173, 1983.
- Black, D., Marabani, M., Sturrock, R. D., Robins, S. P.: Urinary excretion of the hydroxypyridinium cross links of collagen in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 48: 641-644, 1989.
- Spector, T. D., James, I. T., Hall, G. M., Thompson, P. W., Perrett, D.: Increased levels of urinary collagen crosslinks in females with rheumatoid arthritis. *Clin. Rheum.* 12: 240-244, 1993.
- Jhonson, W. J., Dimartino, M. J., Meunier, P. C., Muirhead, K. A., Hanna, N.: Methotrexate inhibits macrophage activation as well as vascular and cellular inflammatory events in rat adjuvant induced arthritis. *J. Rheum.* 15: 745-749, 1988.
- Segal, R., Mozes, E., Yaron, M., Tartakovsky, B.: The effects of methotrexate on the production and activity of interleukin-1. *Arth. Rheum.* 32: 370-377, 1989.
- Firestein, G., Paine, M. M., Boyle, D. L.: Mechanisms of methotrexate action in rheumatoid arthritis—selective decrease in synovial collagenase gene expression. *Arth. Rheum.* 37: 193-200, 1994.
- Hirata, S., Matsubara, T., Saura, R., Tateishi, H., Hirohata, K.: Inhibition of *in vitro* neovascularization by low-dose methotrexate. *Arth. Rheum.* 32: 1065-1073, 1989.
- Connolly, K. M., Stecher, V. J., Danis, E., Pruden, D.

J., Labrie, T. : Alteration of interleukin-1 production and the acute phase response following medication of adjuvant arthritic rats with cyclosporin-A or methotrexate. *Int. J. Immunopharmacol.* 49 : 717-728, 1988.

21) Pozo, E.D., Zapf, J. : Skeletal growth and bone density as sensitive parameters in experimental arthritis : Effect of cyclosporin A. *Bone* 15 : 625-628, 1994.